مجله به‌نژادی نهال و بذر
جلد ۱-۳۳، شماره ۴، سال ۱۳۹۶

طراحی نشانگر مولکولی اختصاصی سیتوپلاسم نرعقیم PET1 در آفتابگردان

Designing Molecular Marker Specific to PET1 Male Sterile Cytoplasm in Sunflower

جواد اکبری افجانی[۱]، مسعود سلطانی نجف‌آبادی[۲] و سید رضاقلی میرفخرایی[۳]

۱ و ۳- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار، گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- استادیار، مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۷/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۲/۲۰

چکیده

اکبری افجانی، ج.، سلطانی نجف‌آبادی، م. و میرفخرایی، س. ر. ۱۳۹۶. طراحی نشانگر مولکولی اختصاصی سیتوپلاسم نرعقیم PET1 در آفتابگردان. **مجله به‌نژادی نهال و بذر ۱-۳۴: ۴۸۵-۴۹.**

نرعقیمی سیتوپلاسمی- ژنتیکی در تولید بذور هیبرید آفتابگردان به طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد. در آفتابگردان، *ORFH522* موجود در انتهای '۳ ژن *atpA* مسئول فنوتیپ نرعقیمی است. این تحقیق به منظور شناسایی نشانگر مولکولی برای سیستم نرعقیمی سیتوپلاسمی- ژنتیکی PET1 در آفتابگردان صورت گرفت. بدین منظور از پنج لاین نرعقیم، ۲۴ لاین نگهدارنده نرعقیمی و ۳۲ لاین بازگرداننده باروری به عنوان مواد ژنتیکی استفاده شد. توالی مربوط به ژن مذکور در دو سیستم نرعقیم و نربارور از پایگاه اینترنتی NCBI دریافت و پس از هم‌ردیفی آن‌ها، بر اساس ناحیه چندشکلی در توالی‌ها، یک جفت آغازگر طراحی شد. این جفت آغازگر، قطعه‌ای با طول ۱۸۲ جفت‌باز در کلیه لاین‌های دارای سیتوپلاسم نرعقیم تکثیر کرد در حالی که در هیچ یک از بوته‌های دارای سیتوپلاسم نربارور تکثیر نشد؛ بنابراین این آغازگر به عنوان نشانگر سیتوپلاسم نرعقیم معرفی می‌شود. همچنین ثابت شد که تمامی لاین‌های بازگرداننده باروری، دارای سیتوپلاسم نرعقیم هستند. بنابراین این نشانگر می‌تواند در برنامه‌های اصلاحی آفتابگردان در مراحل انتقال سیتوپلاسم نرعقیم به لاین‌های جدید و نیز تولید و خالص‌سازی لاین‌های بازگرداننده باروری به‌طور مؤثری مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: آفتابگردان، آغازگر، نرعقیمی سیتوپلاسمی PET1، *ORFH522* و *atpA*

نویسنده مسئول: abdhoorz@modares.ai.ir تلفن: ۰۲۱۴۸۲۹۲۱۳۴

مقدمه

تولیــــــد هیبریــــــد در آفتــــــابگردان (.Helanthus annuus L)، زراعــت ایــن محصول مهم روغنی را متحول کرده است زیـرا ارقـام هیبریـد باعـث افـزایش بیسـت درصـدی عملکرد نسبت به ارقام آزادگرده‌افشان می‌شوند (Leclercq, 1969). تهیه هیبرید آفتـابگردان در سطح تجاری، مرهون شناسایی سیستم نرعقیمـی سیتوپلاســمی- ژنتیکــی و ژن‌هــای هســته‌ای بازگرداننده باروی در ایـن گونـه گیـاهی اسـت (Yue *et al*., 2010). این سیستم در سـال ۱۹۶۹ توسط لکلـرک کشـف شـد (Lecrerq, 1969). تولید هیبرید در آفتابگردان حاصل تلاقـی یـک لاین پدری واجد ژن بازگرداننده باروری (لاین رســتورر) بــا یــک لایــن مــادری نــرعقیم سیتوپلاسمی است.

نـرعقیمـی سیتوپلاسـمی- ژنتیکـی در بـیش از ۱۵۰ گونــه گیــاهی مشــاهده شــده اســت (Kaul, 1998). ایـن سیسـتم در ترکیـب بـا ژن بازگرداننده باروری که در هسته سلول قرار دارد به طور گسترده‌ای در اصلاح نباتات به کار رفته اســت. نرعقیمــی سیتوپلاســمی در گیاهــان، فنوتیپی بـا وراثـت مـادری اسـت کـه در خـلال آن دانــه گــرده بــاروری تولیــد نمــی‌شــود (Chen and Liu, 2014). فنوتیـپ نرعقیمـی بـا یـک ژن میتوکنـدریایی نابـه‌جـا مـرتبط اسـت. تـوالی‌هـای چهـارده ژن میتوکنـدریایی مسـئول نرعقیمی سیتوپلاسمی مشخص شده‌اند که اغلب آن‌هـا ORFهـایی (Open reading frame) متصل به ژن ATP سنتتاز هستند. این ژن‌ها باعث اختلال در وظایف میتوکندری گیاهان می‌شـوند ولـی تغییـری در فنوتیـپ عمـومی گیـاه بوجـود نمی‌آورند. لاین‌های نرعقیمی سیتوپلاسمی قادر به تولید دانه‌های گرده زایا نیستند. دلایل این امر رشد و نمو غیرنرمال دانه گرده، زوال پرچم‌ها یا اجــزای آن‌هــا ویــا تغییــرات هومئوتیــک (Homeotic) از جملـه تبـدیل شـدن پـرچم بـه گلبرگ یا دیگر اندامک‌هاست. علل دقیق وقوع جهشـی کـه منجـر بـه نرعقیمـی سیتوپلاسـمی می‌شود هنوز ناشناخته است، اما در مـواقعی کـه تغییرات هومئوتیک اتفاق می‌افتد، ممکـن اسـت علامــت رتروگــراد (Retrograde signal) از میتوکنـدری نـاقص بـه هسـته فرسـتاده شـود و رونویسی ژن‌های هسته‌ای کنترل‌کننـده جنسـیت اندام‌هـا را تغییـر دهـد (Chen and Liu, 2014؛ Zubko, 2004؛ Chase, 2007؛ Schnable and Wise, 1998) در برخــی گیاهان نرعقیم مانند توتون و گونه‌های براسـیکا (Kofer *et al*., 1991) نمـو بسـاک دچـار تغییرات شدیدی می‌شود، در حالی که در اغلب گونه‌ها، در بوته‌های نـرعقیم نمـو بسـاک نرمـال بوده ولی میکروسپوروژنسیس طی مراحل میـوز و یـا بلافاصلـه پـس از میـوز متوقـف مـی‌شـود (Kaul, 1998).

در اغلــب گونــه‌هــایی کــه نــرعقیمــی در آن‌ها گـزارش شـده، ویژگـی مزبـور بـا بیانیـک ORF در ژنوم میتوکندری ارتبـاط داشـته اسـت (Schnable and Wise, 1998). تا به امـروز در

آفتابگردان بیش از هفتاد منبع نرعقیمی مختلف شناسایی شده است (Serieys, 1999)، ولی در تولید تجاری هیبرید از سیستم سیتوپلاسم PET1 استفاده می‌شود (Leclercq, 1969). توالی‌یابی ORFهای مذکور، مسیر را برای طراحی نشانگرهای مناسب جهت غربال گونه‌های نرعقیم سیتوپلاسمی تسهیل می‌کند. سیستم PET1-CMS در آفتابگردان در یک تلاقی بین گونه‌ای بین *H. annuus* و *H. petiolaris* شناسایی شده است (Leclercq, 1969). این پدیده با بیانیک ژن میتوکندریایی در آفتابگردان به نام *ORFH522* که پلی‌پپتیدی با وزن مولکولی پانزده کیلو دالتون را رمز می‌کند مرتبط است (Laver *et al.*, 1991؛ Moneger *et al.*, 1994؛ Horn *et al.*, 1991). *ORFH522* به‌واسطه یک نوترکیبی از نوع بازآرایی واژگونی/ الحاق در ناحیه'۳ ژن *atpA* ایجاد شده است که بیان دیسیسترونیک (Dicystronic) آن‌ها باعث ایجاد نرعقیمی می‌شود (Laver *et al.*, 1991؛ Horn *et al.*, 1991). سیتوپلاسم نرعقیم دیگری که در آفتابگردان شناسایی و با نام PEF1 معرفی شده است، حاصل تلاقی بین گونه‌ای *H. petiolaris* spp. *fallax* با *H. annuus* است (Serieys and Vincourt, 1987). در سیتوپلاسم PEF1، اثری از *ORFH522*، که مشخصه خاص سیتوپلاسم PET1 است، وجود ندارد (Horn, 2002).

مکانیسم مولکولی نرعقیمی سیتوپلاسمی آفتابگردان هنوز دقیقاً مشخص نیست. میتوکندری گیاهان با مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده ارتباط دارد. بالک و لیور (Balk and Leaver, 2001) گزارش کردند که مرگ برنامه‌ریزی شده زودرس سلول‌های تاپتال (Tapetal) در آفتابگردان باعث ایجاد نقص در تولید دانه گرده شده و در نتیجه گیاه نرعقیم می‌شود. با توجه به این که ژن *atpA* یکی از زیر واحدهای ATPase است، سابار و همکاران (Sabar *et al.*, 2003) نشان دادند که سیتوپلاسم نرعقیم PET1 با کاهش هیدرولیز ATP مواجه شده و از آنجایی که توسعه دانه گرده نیاز به انرژی زیادی دارد، گیاهان دارای سیتوپلاسم PET1 نرعقیم هستند. ناکای و همکاران (Nakai *et al.*, 1995). نیز با اثبات اثر سمیت پروتئین تولید شده از ORFH522 بر روی باکتری *Escherichia coli* و با توجه به این‌که میتوکندری نیز منشأ باکتریایی دارد، علت بروز فنوتیپ نرعقیمی را ایجاد سمیت این پروتئین ذکر کرده‌اند.

گزارش‌هایی مبنی بر وجود ژن‌های عامل نرعقیمی در هسته (Nuclear male sterility) آفتابگردان منتشر شده است. پرز- ویچ و همکاران (Pérez-Vich *et al.*, 2005) وجود این نوع ژن‌ها را در آفتابگردان گزارش و برای آن‌ها نشانگرهای ریز ماهواره معرفی کردند. گنگ و همکاران (Gong *et al.*, 2014) با استفاده از شیوه تجزیه بالک در حال تفرق

(Bulk segregant analysis) و دو گروه ژنوتیپ نربارو و نرعقیم، تعداد زیادی نشانگر ریز ماهواره را آزمون کردند و پیوستگی هشت لوکوس نشانگر را با ژن‌های عامل نرعقیمی هسته‌ای گزارش کردند. با وجودی که توالی عامل نرعقیمی سیتوپلاسمی در آفتابگردان سال‌هاست که شناخته شده است (Köhler *et al*., 1991)، گزارشی مبنی بر طراحی نشانگرهایی برای متمایز کردن سیتوپلاسم نرعقیم از نربارور در دسترس نیست. برای مثال شنابل و همکاران (Schnabel *et al*., 2008) بر اساس توالی‌های لوکوس *atp9* و *orfH522* اقدام به طراحی نشانگری مولکولی جهت متمایز کردن سیتوپلاسم PET1 از سیتوپلاسم PEF1 و سیتوپلاسم بارور کردند.

مراحل تولید لاین‌های مناسب که بتوانند به عنوان والد مادری در فرایند تولید ارقام هیبرید وارد شوند، مستلزم شناخت دقیق از وضعیت سیتوپلاسم نرعقیم آن‌ها است. این شناخت نیازمند کاشت آن‌ها و بررسی فنوتیپ نرعقیمی یا باروری بوته‌ها در مرحله گلدهی بوده و زمان بر است. چنانچه بتوان با بررسی‌های کوتاه مدت و البته دقیق به شناخت مذکور دست یافت، علاوه بر صرفه‌جویی در هزینه‌ها، در زمان کوتاهی وضعیت بسیاری از لاین‌ها از نظر وجود عامل نرعقیمی در سیتوپلاسم تعیین می‌شود. هدف این تحقیق، طراحی و شناخت نشانگرهای مولکولی برای عامل نرعقیمی در سیتوپلاسم آفتابگردان بود. به این منظور با استفاده از پایگاه‌های اطلاعاتی موجود در زمینه لوکوس مسبب نرعقیمی سیتوپلاسمی در آفتابگردان، اقدام به طراحی آغازگرهای مناسب و غربالگری لاین‌های نرعقیم سیتوپلاسمی شد. با استفاده از این نشانگر می‌توان در مرحله گیاهچه، از لاین‌ها DNA را استخراج و نوع سیتوپلاسم آن‌ها را مشخص کرد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و شرایط کشت

در این تحقیق، از پنج ژنوتیپ نرعقیم (A-Line)، ۲۴ ژنوتیپ نگهدارنده نرعقیمی (B-Line) و ۳۲ ژنوتیپ بازگرداننده باروری (R-Line) آفتابگردان استفاده شد. این لاین‌ها در مزرعه پژوهشی مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر در سال ۱۳۹۴ کشت شدند. لاین‌های نرعقیم، فاقد گرده و لاین‌های نگهدارنده و بازگرداننده باروری دارای گرده بودند. وقتی بوته‌ها به مرحله چهار برگی رسیدند، از جوان‌ترین برگ برای استخراج DNA نمونه‌گیری شد.

استخراج DNA

DNA ژنوتیپ‌ها با استفاده از روش CTAB با انجام تغییراتی استخراج شد (Li *et al*., 2007). لازم به ذکر است که در مراحل استخراج DNA ژنومی، DNA میتوکندریایی نیز استخراج می‌شود. به‌منظور

بررسی وضعیت DNA استخراجی از نظر غلظت و خلوص آن از دستگاه اسپکتروفتومتر Cadex مدل SB038 استفاده شد. وضعیت DNA استخراجی روی ژل آگارز یک درصد مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی‌های بیوانفورماتیک

توالی‌های نوکلئوتیدی مربوط به عامل عقیمی سیتوپلاسمی (فرم نرعقیم) و مربوط به سیتوپلاسم‌های نرمال (فرم نگه‌دارنده) به ترتیب با شماره دسترسی X55963 و X53537 (Köhler *et al*., 1991) از پایگاه اینترنتی NCBI گرفته شد. از آن‌جا که عامل ایجاد سیتوپلاسم نرعقیم، ایجاد جهش‌هایی در انتهای '۳ ژن *atpA* در میتوکندری و به وجود آمدن ORFH522 است (Köhler *et al*., 1991). انتهای '۳ ژن این توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار MegAlign نسخه ۷ مورد هم ردیفی قرار گرفت و بر مبنای ناحیه چندشکلی، یک جفت آغازگر با استفاده از نرم‌افزار Primer3 (http://primer3.ut.ee/) طراحی شد.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) و الکتروفورز

جفت آغازگر ORFH522 F/R برای یافتن تمایز نواری بین لاین‌های نرعقیم، نگهدارنده و بازگرداننده باروری در واکنش PCR با نیم رخ حرارتی زیر مورد استفاده قرار گرفتند:

دمای ۹۴°C به مدت پنج دقیقه؛ سی و پنج چرخه در ۹۴°C به مدت سی ثانیه، ۵۲°C به مدت سی ثانیه، ۷۲°C به مدت سی ثانیه؛ و سرانجام ۷۲°C به مدت ده دقیقه. فرآورده‌های حاصل از PCR بر روی ژل آگارز دو درصد بارگیری شدند و قطعات به کمک Safestain (ساخت شرکت سیناکلون) رنگ‌آمیزی و به کمک نور UV قابل رویت شدند.

نتایج و بحث

اسامی و ماهیت مواد ژنتیکی مورد استفاده در جدول ۱ و مشخصات آغازگرهای طراحی-شده برای شناسایی لاین‌های دارای سیتوپلاسم نرعقیم در جدول ۲ آورده شده است.

بر اساس نتایج به دست آمده (شکل ۱) توالی انتهای '۳ ژن *atpA* در دو گیاه نرعقیم و بارور با یکدیگرمتفاوت بود و این بیانگر وجود ORFH522 در گیاه نرعقیم است. هر کدام از این توالی‌ها (X53537 و X55963) از دو CDS تشکیل شده که یکی از آن‌ها مربوط به ژن *atpA* و دیگری مربوط به *ORFH522* است. این دو ژن به‌صورت دی‌سیسترونیک بیان می‌شوند.

نتیجه هم‌ردیفی بین توالی گیاه نرعقیم و نربارور (شکل ۱) نشان می‌دهد که از ابتدای کدون آغاز ORFH522، در سی نوکلئوتید بین گیاه نرعقیم و نربارور شباهت وجود دارد و مابقی آن‌ها متفاوت است. آغازگرهایی بر اساس تفاوت این دو توالی طراحی شد که در جدول ۲ ارائه شدند. این آغازگرها بر اساس

جدول ۱- اسامی و ماهیت مواد ژنتیکی مورد استفاده
Table 1. Name and nature of the genetic materials

نام لاین Line name	ماهیت ژنتیکی Genetic nature	نام لاین Line name	ماهیت ژنتیکی Genetic nature
BF181-436	B-Line	B4-5	B-Line
BF81-196	B-Line	B8-1	B-Line
B Line 1221	B-Line	B2-1	B-Line
BF80-427/1/3	B-Line	B3-2	B-Line
BF820436/1/3	B-Line	BF82-067	B-Line
BF80-420/1/1	B-Line	AF80-427	A-Line
BF810029/1/1	B-Line	CMS 19	A-Line
BF82-042/2/1	B-Line	AF82060	A-Line
BF82-06	B-Line	AF82042	A-Line
BF82-067/1/1	B-Line	AF81067	A-Line
BF80-501/1/1	B-Line	RF81-131/1	R-Line
BF82-060/2/1	B-Line	RF81-2201	R-Line
BF80-533/1/1	B-Line	RF81-137/1	R-Line
BF82-061	B-Line	RF81-25	R-Line
BF82-061	B-Line	RF81-74	R-Line
BF81-131	B-Line	RF81-30	R-Line
B9-2	B-Line	RF81-1/601	R-Line
B9-3	B-Line	RF80-427	R-Line
B4-1	B-Line	RF81-1-601	R-Line
	R-Line		
RF81-1/2	R-Line	RF81-25	R-Line
RF82-A0636	R-Line	RF81-82	R-Line
RF81-74	R-Line	RF80-501	R-Line
RF81-82	R-Line	RF81-65	R-Line
R6-1	R-Line	RF82-542	R-Line
R1-1	R-Line	RF80-533	R-Line
R2-1	R-Line	RF80-420/1/1	R-Line
R5-1	R-Line	RF81-30	R-Line
R10-1	R-Line	RF81-65	R-Line
R7-1	R-Line	RF81-1-6-1	R-Line
R3-2	R-Line	RF81-1/2	R-Line

B-Line: لاین نگهدارنده نرعقیمی
A-Line: لاین نرعقیم سیتوپلاسمی
R-Line: لاین بازگرداننده باروری

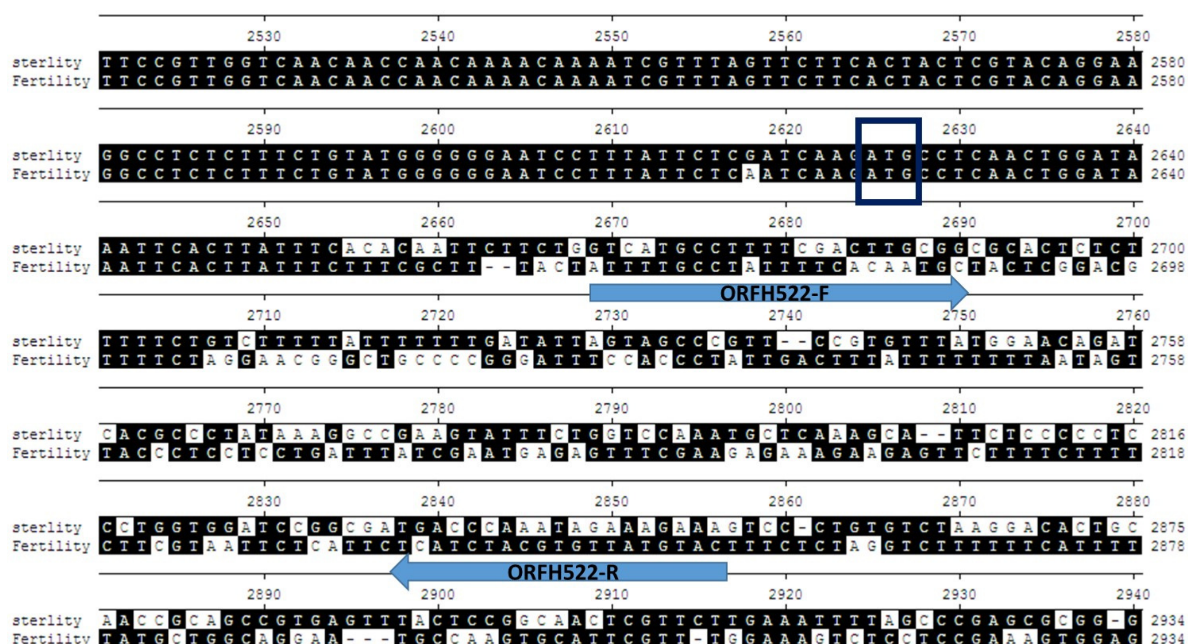
B-Line: Maintainer line
A-Line: Cytoplasmic male sterile line
R-Line: Fertility restorer line

جدول ۲- آغازگرهای طراحی شده بر مبنای *ORFH522* برای شناسایی لاین‌هایی با سیتوپلاسم نرعقیم
Table 2. Designed primers based on ORFH522 to identify lines bearing male sterile cytoplasm

نام آغازگر Primer name	توالی آغازگر Primer sequence	نوع آغازگر Primer sort
ORFH522-F	5'-AGTAGCCCGTTCCGTGTTTA-3'	مستقیم Forward
ORFH522-R	5'-AGAACGAGTTGCCGGAGTAA-3'	معکوس Reverse

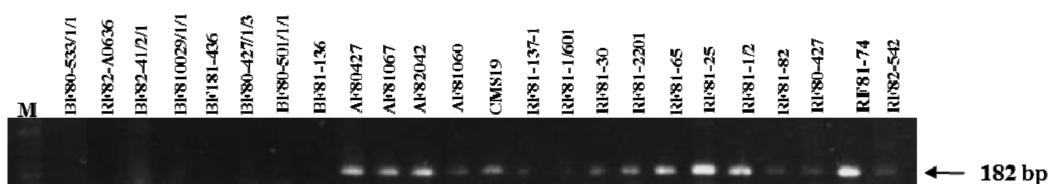
اختلاف بین ژنوم میتوکندری گیاه نرعقیم و بارور طراحی شد و به همین دلیل است که DNA به طول ۱۸۲ جفت‌باز در گیاهان نرعقیم تکثیر می‌شود در حالی که تکثیر آن در گیاهان با سیتوپلاسم غیرعقیم مشاهده نمی‌شود.

مطابق انتظار، جفت‌آغازگرهای مذکور قادر بودند بین لاین‌هایی با سیتوپلاسم نرعقیم و نربارور تمایز ایجاد کنند (شکل ۲) در لاین‌های



شکل ۱- هم‌ردیفی انتهای '۳ ژن *atpA* در گیاه نرعقیم (توالی بالایی با شماره دسترسی X55963) و نربارور (توالی زیرین با شماره دسترسی X53537). همولوژی توالی‌ها با کادر سیاه‌رنگ نشان داده شده‌اند. مستطیل مشخص‌شده روی شکل، کدون آغاز ORFH522 را نشان می‌دهد.
آغازگرهای پیشرو و معکوس با پیکان روی شکل نشان داده شده‌اند.

Fig. 1. Sequence alignment of 3′ end of atpA gene in male sterile plant (upper sequence with accession number X55963) and male fertile plant (lower sequence with accession number X53537). The homology between sequences are shown in black boxes. The box in the sequences indicates the start codon of the ORFH522. Forward and reverse primers are shown with arrow.



شکل ۳- الگوی نواربندی فرآورده‌های PCR با استفاده از آغازگرهای طراحی‌شده بر مبنای *ORFH522* آفتابگردان

AF و CMS: لاین‌های نرعقیم، RF: لاین‌های بازگرداننده باروری و BF: لاین‌های نگهدارنده نرعقیمی.
وجود نوار با اندازه ۱۸۲ جفت باز در تمامی لاین‌های نرعقیم و برگرداننده باروری مشهود است.

Fig. 3- Banding pattern of PCR products generated by designed primers based on ORFH522 in sunflower

AF and CMS: Cytoplasmic male sterile lines, RF: Restorer fertility lines, and BF: Maintainer lines. A band with 182 bp in length is observed for all CMS and RF lines. M stands for 50 bp DNA size ladder (Cinnaclone Co.).

نـــــرعقیم (CMS19، AF81060، AF82042، AF81067 و AF80427) نـواری بـا طـول ۱۸۲ جفت‌باز تکثیر شد در حـالی کـه ایـن تکثیـر در لایـــن‌هـــای نگهدارنـــده (BF810029/1/1، BF81-136، BF181-436، BF80-533/1/1، BF80-501/1/1، BF80-427/1/3 و BF82-41/2/1) رخ نـــداد و ایـــن موضـــوع نشان‌دهنده وجود تـوالی تکثیـری در لایـن‌هـای واجـد سیتوپلاســم نـرعقیم اســت. مشخصــه لایــن‌هــای بازگرداننــده بـاروری، وجــود ژن بازگرداننــده بــاروری در هســته آن‌هــا اســت. سیتوپلاسم این لاین‌ها می‌تواند نرعقیم یا نربارور باشد ولی به دلیل ایـن‌کـه بیشـتر منبـع اسـتخراج لایـــن‌هـــای بازگرداننـــده بـــاروری در ایـــران هیبریدهای تجاری اسـت، در نتیجـه سیتوپلاسـم آن‌ها نرعقیم خواهند بود. نتایج به‌دست آمـده از ایـن نشـانگر همچنـین مشـخص کـرد کـه همـه لاین‌هـای بازگرداننـده بـاروری مـورد بررسـی، دارای سیتوپلاسم نرعقیم نیز هستند.

تولید هیبریـد آفتـابگردان در سـطح تجـاری مستلزم فراهم آوردن لاین‌های مادری نـرعقیم و پـدری بازگرداننـده بـاروری اسـت. در برنامـه اصلاحی آفتابگردان ایران، هر ساله تعداد زیادی لاین اینبرد تولید می‌شود که پس از ارزیابی‌های ترکیب‌پذیری، در مسیر تبـدیل بـه والـد پـدری (رسـتورر لایـن) و یـا والـد مـادری (لایـن بـا سیتوپلاسـم نـرعقیم) وارد مـی‌شـوند. در مسـیر تبدیل لاین‌های اینبرد به نرعقیم، لاین مطلوب با یک لاین واجد سیتوپلاسـم نـرعقیم تلاقـی داده می‌شود. با این حال وضعیت سیتوپلاسم نتـاج تـا زمان آشکار شدن گل‌ها به طور قـاطع مشـخص نیست، زیرا امکان اختلاط‌های ناخواسته همواره وجود دارد. در اختیار بودن ابزاری بـرای متمـایز کردن نتاج نرعقیم از غیر نرعقیم در مراحل اولیه رشد، امکان مدیریت بهتـر مـواد ژنتیکـی را (بـه جهـت کـاهش مـواد) فـراهم مـی‌کنـد و باعـث کاهش هزینه‌های کاشت و داشت مـی‌شـود. بـر اساس نتایج حاصل از این بررسی، با انجام یـک PCR با استفاده از آغازگرهای طراحـی‌شـده در این تحقیق و مشاهده نواری با اندازه ۱۸۲ جفـت باز، که فقط در لاین‌های بـا سیتوپلاسـم نـرعقیم PET1 قابـل حصـول اسـت و لایـن‌هـای بـا سیتوپلاسـم نربـارور فاقـد آن هسـتند، قـادر بـه اعلام‌نظر سریع در خصـوص حضـور و یـا عـدم حضور سیتوپلاسم نرعقیم در لاین‌های مورد نظر بودیم. بنابراین بدون نیاز بـه صـرف زمـان بـرای عملیات داشت در مراحل اولیه رشد گیاهچه‌هـا، قادر به تشخیص نوع سیتوپلاسـم آن‌هـا خـواهیم بـود. همچنـین مشـخص شـد کـه لایـن‌هـای بازگرداننـده بـاروری مـورد بررسـی همگـی از خودگشنی هیبریدهای تجاری به دست آمده‌اند. مواردی از شناسایی نشانگرهای مولکولی مبتنـی بـر تـوالی بـرای تشـخیص سیتوپلاسـم نـرعقیم PET1 در آفتابگردان گزارش شده است. ولـی این گزارش‌ها با استفاده از تعداد بسیار محدودی لایـن انجـام شـده اسـت. بـرای مثـال شـنابل و همکاران (Schnabel *et al.*, 2008) با طراحـی نشانگری مبتنی بر توالی لوکوس‌هـای دخیـل در

نرعقیمی سیتوپلاسمی در آفتابگردان، قادر به متمایز کردن سیتوپلاسم PET1 از سیتوپلاسم نربارور بودند. در پژوهش یاد شده، نشانگر طراحی‌شده با ایجاد نواری به اندازه ۵۲۰ جفت باز قادر به متمایز کردن لاینی با سیتوپلاسم نرعقیم PET1 از یک لاین با سیتوپلاسم نرعقیم PEF1 و یک لاین با سیتوپلاسم نربارور بود. در حالی که در پژوهش حاضر، نواری با اندازه ۱۸۲ جفت باز قادر به متمایز کردن سیتوپلاسم PET1 از سیتوپلاسم نربارور در تعداد زیادی لاین بود.

خالص سازی لاین‌های بازگرداننده باروری از موضوعات چالش‌برانگیز در تولید والدین هیبریدهای آفتابگردان است. وجود چند شاخگی از ویژگی‌های مطلوب لاین‌های مذکور است که در مراحل استخراج این لاین‌ها از هیبریدهای تجاری و نسل‌های خودگشنی متعاقب آن، مورد توجه قرار می گیرد. از سوی دیگر اغلب ژنوتیپ‌های آجیلی آفتابگردان نیز دارای صفت چند شاخگی هستند. تمایز بین این دو گروه مواد ژنتیکی چندشاخه مستلزم یک نسل تلاقی آزمون با یک لاین نرعقیم است. لاین‌های چندشاخه‌ای که از خودگشنی هیبریدهای تجاری به دست آمده‌اند دارای سیتوپلاسم نرعقیم هستند، بنابراین بر اساس نتایج این تحقیق بایستی دارای نوار ۱۸۲ جفت بازی در فرآورده‌های حاصل از PCR باشند. بنابراین، این نوار می‌تواند متمایزکننده لاین‌های چندشاخه حاصل از خودگشنی هیبریدهای تجاری و ژنوتیپ‌های آجیلی چندشاخه آفتابگردان باشد. بیان این نکته ضروری است که اساساً ژنوتیپ‌های چندشاخه آجیلی به دلیل نیاز به تولید دانه، فاقد سیتوپلاسم نرعقیم هستند. پس با استفاده از اطلاعات سیتوپلاسم ژنوتیپ‌های چندشاخه که به کمک نشانگر طراحی‌شده در این تحقیق قابل حصول است، می‌توان در خصوص ماهیت چندشاخگی (چندشاخگی حاصل از خودگشنی هیبریدهای تجاری و چندشاخگی موجود در ژنوتیپ‌های آجیلی) اعلام نظر کرد. این موضوع می‌تواند برای اثبات کیفیت مزارع تولید بذر لاین‌های بازگرداننده باروری و عدم حضور ژنوتیپ‌های چندشاخه آجیلی که توسط مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال انجام می‌شود، مورد استفاده قرار گیرد.

در این مقاله، با استفاده از اطلاعات مولکولی لوکوس مسبب نرعقیمی سیتوپلاسمی (سیتوپلاسم PET1) و انجام واکنش PCR، دو موضوع کاربردی مرتبط با تولید هیبرید آفتابگردان در برنامه‌های به‌نژادی و نیز کنترل مزارع تولید بذر این گیاه برای تولید در سطح تجاری مطرح شد که قابلیت کاربرد عملی دارند. به‌منظور تأیید نتایج این تحقیق لازم است آزمون PCR با استفاده از آغازگرهای طراحی‌شده در مطالعه حاضر بر روی تعداد بیشتری لاین نرعقیم، بازگرداننده باروری و نگه‌دارنده و چندین لاین آجیلی چندشاخه بررسی شود.

سپاسگزاری

این پژوهش در آزمایشگاه مولکولی بخش تحقیقات دانه‌های روغنی مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر انجام شد که بدین‌وسیله تشکر و قدردانی می‌شود.

References

Balk, J., and Leaver, C. J. 2001. The PET1-CMS mitochondrial mutation in sunflower is associated with premature programmed cell death and cytochrome c release. The Plant Cell 13: 1803-1818.

Chase, C. D. 2007. Cytoplasmic male sterility: a window to the world of plant mitochondrial-nuclear interactions. Trends in Genetics 23:81-90.

Chen, L., and Liu, Y. G. 2014. Male sterility and fertility restoration in crops. Annual Review of Plant Biology 65: 579-606.

Gong, L., Li, C., Capatana, A., Feng, J., Qi, L., Seiler, G. J., and Jan, C. C. 2014. Molecular mapping of three nuclear male sterility mutant genes in cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.). Molecular Breeding 34: 159-166.

Horn, R. 2002. Molecular diversity of male sterility inducing and male-fertile cytoplasm in the genus *Helianthus*. Theoretical and Applied Genetics 104: 562-570.

Horn, R., Köhler, R. H., and Zetsche, K. 1991. A mitochondrial 16 kDa protein is associated with cytoplasmic male sterility in sunflower. Plant Molecular Biology 17: 29-36.

Kaul, M. L. H. 1998. Male Sterility in Higher Plants: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 1005 p.

Kofer, W., Glimelius, K., and Bonnett, H. T. 1991. Modifications of mitochondrial DNA cause changes in floral development in homeotic-like mutants of tobacco. The Plant Cell 3: 759-769.

Köhler, R. H., Horn, R., Lössl, A., and Zetsche, K. 1991. Cytoplasmic male sterility in sunflower is correlated with the co-transcription of a new open reading frame with the *atpA* gene. Molecular and General Genetics 227: 369-376.

Laver, H. K., Reynolds, S. J., Moneger, F., and Leaver, C. J. 1991. Mitochondrial genome organization and expression associated with cytoplasmic male sterility in sunflower (*Helianthus annuus*). The Plant Journal 1: 185-193.

Leclercq, P. 1969. Une stérilité male cytoplasmique chez le Tournesol (*Helianthus annuus* L.). Annals Amélior Plant 19: 99-106 (in French).

Li, J. T., Yang, J., Chen, D. C., Zhang, X. L., and Tang, Z. S. 2007. An optimized mini-preparation method to obtain high-quality genomic DNA from mature leaves of sunflower. Genetics and Molecular Research 6: 1064-1071.

Moneger, F., Smart, C. J., and Leaver, C. J. 1994. Nuclear restoration of cytoplasmic male sterility in sunflower is associated with the tissue-specific regulation of a novel mitochondrial gene. The EMBO Journal 13: 8-17.

Nakai, S., Noda, D., Kondo, M., and Terachi, T. 1995. High-level Expression of a Mitochondrial*orf 522* Gene from the Male-sterile Sunflower is Lethal to *E. coli*. Japanese Journal of Breeding 45: 233-236.

Pérez-Vich, B., Berry, S. T., Velasco,L., Fernandez-Martinez, J. M., Gandhi, S., Freeman, C., Heesaker, A., Knapp, S. J., and Leon, A. J. 2005. Molecular mapping of nuclear male sterility genes in sunflower. Crop Science 45: 1851-1857.

Sabar, M., Gagliardi, D., Balk, J., and Leaver, C. J. 2003. ORFB is a subunit of F1F(O)-ATP synthase: insight into the basis of cytoplasmic male sterility in sunflower. EMBO Reports 4: 381-386.

Schnable, P. S., and Wise, R. P. 1998. The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration. Trends in Plant Science 3: 175-180.

Schnabel, P. S., Engelmann, U., and Horn, R. 2008. Development of markers for the use of the PEF1 cytoplam in sunflower hybrid breeding. Plant Breeding 127: 587-591.

Serieys, H., and Vincourt, P. 1987. Characterization of some new CMS sources from *Helianthus* genus. Helia 10: 9-13

Serieys, H. 1999. Identification, study, and utilization in breeding programs of new CMS sources. FAO progress report. Helia 22 (special issue): 71-84.

Yue, B., Vick, B. A., Cai, X., and Hu, J. 2010. Genetic mapping for the *Rf1* (fertility restoration) gene in sunflower (*Helianthus annuus* L.) by SSR and TRAP markers. Plant Breeding 129: 24-28.

Zubko, M. K. 2004. Mitochondrial tuning fork in nuclear homeotic functions. Trends in Plant Science 9: 61-64.